

佐賀大農彙 (Bull. Fac. Agr., Saga Univ.) 95 : 29 ~ 38 (2010)

ダイズ突然変異体ライブラリーの増幅を目的とした Multiple Displacement Amplification (MDA) 法の最適化

中島 皓子・穴井 豊昭
(植物遺伝育種学研究室)
平成21年10月 1 日 受理

Optimization of Multiple Displacement Amplification (MDA) Method in order to Amplify
Soybean Mutant Libraries

Hiroko NAKASHIMA and Toyoaki ANAI
(Laboratory of Plant Genetics and Breeding)
Accepted October 1, 2009

Summary

In our laboratory, we have been studied about the function for commercially important genes of soybean and the application of them for molecular breeding purpose by using a reverse genetics technique with the information of soybean genome. As a part of our project, “Soybean mutant library” have been developed and preserved. This “Mutant library” consists of approximately 36,000 M 3 seeds and their genomic DNAs that are obtained from different mutagens (such as X-ray or EMS) treated populations. This “Mutant library” is an indispensable material for reverse genetic research using Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING)-like method, but it is quite difficult to provide an adequate amount of genomic DNAs due to screening for huge numbers of target genes. The re-extraction and/or scale-up preparation of genomic DNAs from these large numbers of mutant lines are very labor-intensive and nearly impossible, and so it have been desired to develop the efficient method for re-amplification of the once prepared genomics DNA set *in vitro*.

However, there is no report applying re-amplified genomic DNAs for TILLING analysis as templates. In this study, we try to evaluate the re-amplification efficiency of “Soybean mutant library” by using Multiple Displacement Amplification (MDA) method that has a higher fidelity and amplification efficiency than the other *in vitro* amplification methods for genomic DNA. As a result, it demonstrated that re-amplified genomic DNAs with the MDA method optimized in this study had an enough quality as TILLING templates.

Key words : MDA, Mutant library, Phi29 DNA polymerase, Soybean, TILLING

緒 言

近年, 様々な生物種のゲノム塩基配列情報が急速に整備され, 作物育種の分野においてもこれらの情報を活用した分子育種技術の発展が期待されている. この様な背景に加え, 最近では TILLING 法¹⁾を筆頭とする新たな DNA ベースの突然変異体スクリーニング法が開発され, ゲノム情報に基づいた逆遺伝学的手法による作物の改良もいよいよ現実味を帯びてきた.

そこで我々は、ゲノム情報を利用したダイズ (*Glycine max* L. Merr.) 育種の効率化を目的として、X-線や EMS 等を変異原として作成した突然変異体集団より、それぞれの系統に対応する M3 種子とゲノミック DNA を収集し、“ダイズ突然変異体ライブラリー”として保存しており、その数は2009年1月現在で約36,000系統にのぼる。この“突然変異体ライブラリー”は、既にいくつかの脂肪酸合成酵素遺伝子や開花期調節遺伝子に変異を生じた有用突然変異系統の単離に利用されているが²⁾、このライブラリー中にはそれ以外にも様々な遺伝子上に突然変異を生じた系統が含まれていると予測され、多様な突然変異系統のスクリーニングに利用が可能であると考えられる。しかしながら、この様に大規模な突然変異体集団の維持、とりわけ DNA サンプルの再調整には莫大な労力を要することから、一旦調整した DNA セットを様々な標的遺伝子のスクリーニングに使用できることが望ましい。そのためには、予め十分量の DNA を確保しておくことが望ましいが、変異体集団規模の拡大に伴い、個々の植物体から DNA 抽出を行う際のスケールアップはその労力を考慮すると現実的には極めて困難である。そこで、すでに保存されている少量のゲノム DNA サンプルを鋳型として *in vitro* で再増幅することができれば、一旦作成した変異体の DNA セットをより有効に使用できると考えられる。

これまで、ヒトの単一細胞や血液など希少サンプルからのゲノム DNA の回収等を目的として、様々な全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification) 法が開発されてきたが、その多くは PCR 法を基本とした方法であったため煩雑な温度管理が必要であり、使用する *Taq* DNA ポリメラーゼの特性による複製エラー率の高さと伸長性の低さがネックとなっていた。そのため、せいぜい 5 ~ 6 kbp 程度の短い DNA 断片しか増幅することができず、ゲノム全体を均一かつ正確に増幅することは難しかった^{3,6)}。これに対し、2002年に報告された MDA (Multiple Displacement Amplification) 法は、バクテリオファージ由来の Phi29 DNA ポリメラーゼ⁷⁾を利用したランダムプライミングによりゲノム全体を増幅させる方法である⁸⁾。この方法に用いる Phi29 DNA ポリメラーゼは複製エラー率が $10^{-6} \sim 10^{-7}$ と極めて低く、伸長性も優れていることから、オリジナルの塩基配列を忠実に反映したゲノム DNA の増幅が可能であり、平均鎖長も 70 kbp 以上の長鎖 DNA が得られる^{9,11)}。また、このポリメラーゼは DNA 合成の進行方向上流に存在する 2 本鎖 DNA 構造を 1 本鎖に剥がしながら伸長を続けるという特徴を持つため¹¹⁾、PCR 法のように厳密な温度管理を必要とせず、反応液を 30℃ の一定温度に保温するだけで連続的に DNA の複製反応が続き、ごく少量の DNA サンプルから一晩で約 1,000 ~ 100,000 倍もの量の増幅産物を得られることから、多検体試料の処理に適していると考えられる (図 1)。更に、この増幅産物は SNPs 解析やシーケンス解析の材料としても十分使用可能であることも報告されている^{8,12)}。

このような利点を持つ、MDA 法は、我々が開発してきたダイズ突然変異体ライブラリーの様に多数の検体を含むサンプルの増幅に適した DNA 増幅法であると考えられる。しかしながら、市販されている MDA 法を利用した DNA 増幅キットや、Phi29 DNA ポリメラーゼは極めて高価であり、今回の様な多検体試料への利用は難しいことに加え、数系統分のゲノム DNA を混合したプール DNA を鋳型とした反応において、マイナーアリの塩基配列をどの程度忠実に複製するかについての知見は全く得られていなかった。

そこで、本研究では高純度の組換え型 Phi29 DNA ポリメラーゼを調製し、得られた酵素を用いた MDA 法により再増幅を行った DNA プールを鋳型とした場合に、TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 法による突然変異系統の検出が可能であるかという点について検証を行った。

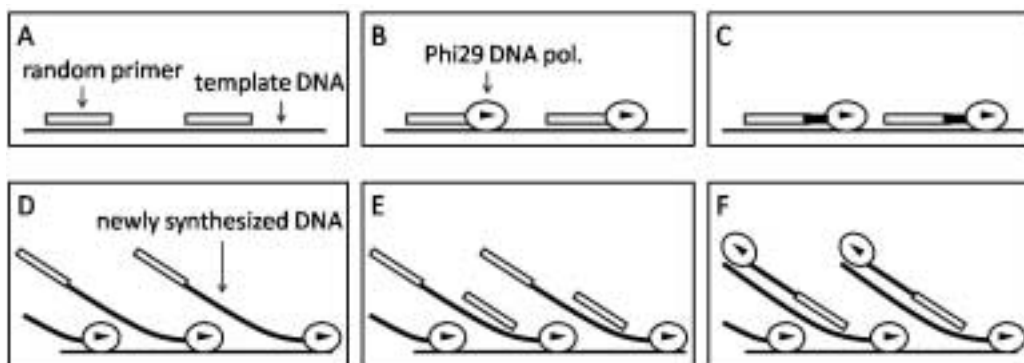


図1 . MDA 法の原理

アルカリ変性した鋳型 DNA に結合した部分ホスホチオエート化ランダムプライマー (A), 鋳型・プライマー複合体を認識した Phi29 DNA ポリメラーゼ (B), Phi29 DNA ポリメラーゼによる新生鎖の合成・伸長 (C, F), Phi29 DNA ポリメラーゼによる鎖置換反応 (E), 新生鎖・プライマー複合体を認識した Phi29 DNA ポリメラーゼによる二次新生鎖の合成・伸長 (F)。

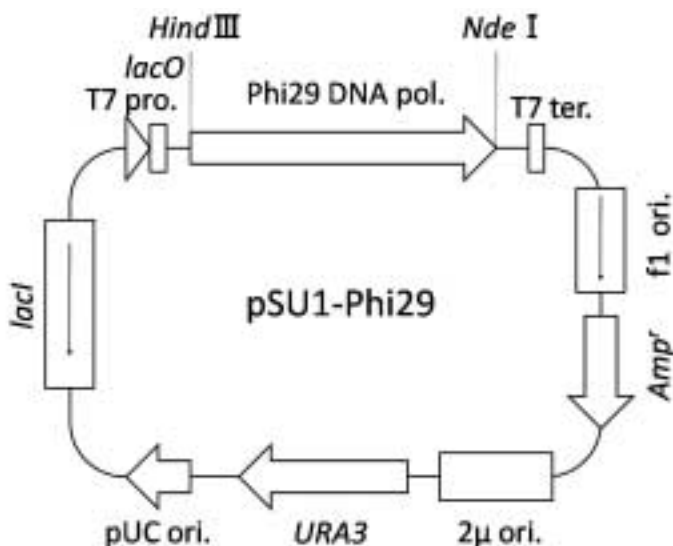


図2 . Phi29 DNA ポリメラーゼ発現用プラスミドの構造

2 μ ori. : 酵母 2 μ 複製開始点, Amp^r : アンピシリン耐性遺伝子, f1 ori. : M13ファージ複製開始点, lacI : lac リプレッサー, lacO : lac オペレーター, Phi29 DNA pol. : Phi29 ファージ p3 遺伝子, pUC ori. : pUC 複製開始点, T7 pro. : T7ファージプロモーター, T7 ter. : T7ファージターミネーター, URA3 : ウラシル要求性マーカー遺伝子。

材 料 と 方 法

1 . 大腸菌中での組換え型 Phi29 DNA ポリメラーゼの発現と精製

T7 プロモーターの下流に Phi29 DNA ポリメラーゼの遺伝子を組込んだ大腸菌発現用プラスミド (図2) は, 酵母相同組換え系¹³⁾を用いて作成した。続いて, このプラスミドを導入した BL21(DE3) RIL 株を抗生物質を含む LB 液体培地に植菌し, 37℃で OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.6 となるまで培養し, 最終濃度 1 mM の IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) を添加後, 30℃で

約3時間タンパク質の発現を誘導した。

組換え型 Phi29 DNA ポリメラーゼの精製は Lázaro ら¹⁴⁾の方法を一部改変して行った。凍結保存していた菌体を湿重量の約6倍量の1 M NaCl を含む Buffer A [50mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 7mM 2-mercaptoethanol, 5 %グリセロール (v/v)] に懸濁した後、最終濃度3 mg / ml の Lysozyme を加え、氷上で10分間の超音波処理を行うことにより菌体を破砕した。その後、得られた菌体抽出液に、PEI (polyethylene imine) を加え、大腸菌由来の DNA を沈殿・除去した。この上清より、35-65%飽和の硫酸沈殿によって回収された画分を0.2 M NaCl を含む Buffer A で透析した後、Phosphocellulose P-11 (Whatman[®]) カラムに吸着させ、0.35 ~ 1 M の NaCl による直線グラジエントで溶出を行った。次に、プールした活性画分を塩濃度が0.2 M NaCl となるように Buffer B (Buffer A + 2mM ZnSO₄) で希釈した後、再度 Phosphocellulose P-11 カラムに吸着させ、0.7 M NaCl を含む Buffer B で溶出した。続いて、回収した活性画分を Buffer B で約3.5倍に希釈した後、Blue-Sepharose (GE Healthcare) カラムに吸着させ、0.8 ~ 1 M の NaCl による直線グラジエントで溶出した。更に、得られた活性画分を Buffer B で塩濃度が0.3 M NaCl となるように調整した後、Heparin-Sepharose (GE Healthcare) カラムに吸着させ、0.8 M NaCl を含む Buffer B で溶出した。最終的に得られた活性画分は、終濃度50%のグリセロール (v/v)、0.5%の NP-40 (Fluka) および0.5%の Tween-20 (SIGMA-ALDRICH) を加えて -20 °C に保存した。

2. ゲノミック DNA の調整

ゲノミック DNA の抽出はダイズ (品種 Bay) 緑葉組織を材料として、改変した CTAB 法¹⁵⁾を用いて行った。また、得られたゲノミック DNA は既知の濃度のゲノミック DNA とともに1%アガロースゲルを用いて100V で30分間電気泳動を行った後、EtBr を用いて染色し、比較することにより純度および濃度を確認した。

3. MDA 法による DNA の増幅と精製

MDA 法では、はじめに鎖型となる二本鎖 DNA をアルカリ処理等により一本鎖 DNA に変性させた後、部分ホスホチオエート化ランダムプライマーを結合させる (図1A)。続いて、この複合体を Phi29 DNA ポリメラーゼが認識し、新生 DNA 鎖の合成・伸長が開始される (図1B, C)。その後新生鎖の伸長に伴い、DNA の鎖置換が起こる (図1D)。更に、その結果生じる新生鎖の一本鎖部分へのプライマーの結合により (図1E)、繰返し新生鎖の合成・伸長が続く、連続的に DNA 増幅が行われる (図1F)。

具体的には、鎖型 DNA に最終濃度50μM の部分ホスホチオエート化ランダムプライマー (5' NNNNsNsNsN 3') と等量のアルカリ変性溶液 [50mM KOH, 1.25mM EDTA] を加え一本鎖に変性させた後、25mM の HCl で中和した。この溶液にそれぞれの最終濃度で 1 mM の dNTPs, 40mM の Tris-HCl (pH7.5), 40mM の KCl, 10mM の MgCl₂, 5 mM の (NH₄)₂SO₄, 4 mM の DTT, 1 unit/ml のピロフォスファターゼおよび 1 unit/μl の Phi29 DNA ポリメラーゼを加え、30°C で17時間反応させた。反応後、65°C で15分間加熱して酵素反応を停止させた。また、イソプロパノール沈殿は、増幅産物に対し 1/10量の 3 M NaOAc (pH6.0) および1.5倍量のイソプロパノールを加え、-80°C に1時間静置した後、遠心分離によって DNA を回収し、等量の TE バッファーに溶解した。PEG 沈殿は、増幅産物に対し、最終濃度で 1 M の NaCl および15%の PEG を加え氷上に1時間静置した後、遠心分離によって DNA を沈殿し、70%エタノールで洗浄した。ゲル濾過は、バイオスピナラム30-Tris (BIO-RAD) を使用し、添付の説明書に従っ

で行った。

4. PCR 法による DNA の増幅

4 種類の遺伝子 (*GmFAD2-1a*, *GmFAD2-1b*, *GmSte-2a* および *GmActin*) の検出には、それぞれの配列に特異的なプライマーセット (*GmFAD2-1a*-INT1-F1; 5'-tacatattacacattcagcaaaacaactga-3' および *GmFAD2-1*-Full-H-R1; 5'-gggaagcttatcacaaaagtcattacgcggcaa-3', *GmFAD2-1b*-INT1-F1; 5'-tctgtcacttccctccattcatttg-3' および *GmFAD2-1*-Full-H-R1; 5'-gggaagcttatcacaaaagtcattacgcggcaa-3', *GmSte-2*-Full-F1; 5'-cccaccaccgccacttctccgccgtta-3' および *GmSte-2*-SEQ5R; 5'-agaaagctccgattgccatgtcacgt-3' もしくは *GmACT1HT*-F1; 5'-gtttcgacaaatggaacaggaacaggaatggttaag-3' および *Soy-Actin*-R; 5'-taattcatgtacttggggc-3') を用い、最終濃度が 40mM の Tricine-KOH (pH 9.2), 15mM の KOAc (pH 6.0), 3.5mM の Mg(OAc)₂, 3.75μg/ml の BSA, 0.005% Tween-20, 0.005% の NP-40, 200 μM の dNTPs, 50units/ml の Pfu DNA ポリメラーゼ, 各 1 μM のプライマーセットおよび 30~0.03ng/μl の鋳型 DNA を含む反応液を調整し PCR による増幅を行った。なお、本 PCR では、95℃で 5 分間の処理を一回行った後、95℃で 30 秒間; 65℃で 30 秒間; 72℃で 90 秒間の処理を 35 回繰り返し、最後に 72℃で 5 分間の処理を一回行うプログラムを用いた。また、TILLING 法による変異の検出に用いた 5 種類の遺伝子 (*GmFAD2-1a*, *GmFAD2-1b*, *GmphyA1*, *Gmβ-1,3-Glucanase* および *GmFAD3-2a*) の増幅には、それぞれの配列に特異的なプライマーセット (*GmFAD2-1*-Full-F3; 5'-attgatagccctccgttcccaaga-3' および *GmFAD2-1*-SEQ-3R; 5'-attgtgagtgtgacgagaagagaaac-3', *GmFAD2-1b*-INT1-F1 および *GmFAD2-1*-Full-H-R1, *phyA1*-L34844-F; 5'-cctagccaatcatccagcaattcaa-3' および *Gm38 × 67*-R1; 5'-gtgcatctcgcacgcatacacac-3', *Gm13glu*-F2; 5'-gatcaattacagtttcaatccaagtca-3' および *Gm13glu*-R1; 5'-gagtaatcagcaccgagtttatga-3', *GmFAD3-2a*-Full-F; 5'-gtgacatgtatgaatgatgtatcttga-3' および *GmFAD3-2a*-INT1-R; 5'-gtgtgcatgtataaagaagtgtga-3') を用い、他は前述の条件に従って PCR 反応を行った。ただし、*Gmβ-1,3-Glucanase* および *GmFAD3-2a* についてはアニーリング温度のみを、65℃から 58℃に、伸長時間を 90 秒間から 2 分間にそれぞれ変更したプログラムを用いた。

5. TILLING 法による変異の検出

KK21 系統および Bay 由来のゲノミック DNA を 1 : 1, 8 : 1 もしくは 16 : 1 の 3 段階の混合比で予め混合し、前述の MDA 法に供した。その後、得られた増幅産物 50ng を鋳型として、前述の PCR 法により *GmFAD2-1a* 遺伝子の増幅を行った後、得られた PCR 産物を再度熱変性した後、ゆっくりとヘテロデュプレックスの形成を促した。この溶液に、それぞれの最終濃度が 200mM の HEPES-NaOH (pH 6.5), 10mM の KCl, 3mM の MgCl₂, 0.01% の TritonX-100 および 0.025unit/μl の CEL 1 を加え、37℃で 20 分間反応させた。その後、2% アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、GelRed (Biotium) 染色によりそれぞれの DNA の切断パターンを解析した。

また、その他 4 遺伝子についても、鋳型として、8 系統分の DNA を混合した DNA プールを MDA 法により増幅した以外は、前述と同様の条件で検出を行った。

結果および考察

1. 組換え型 Phi29 DNA ポリメラーゼの発現と精製

Phi29 DNA ポリメラーゼの発現を確認するため、得られた大腸菌抽出液を 7.5% の SDS-PAGE

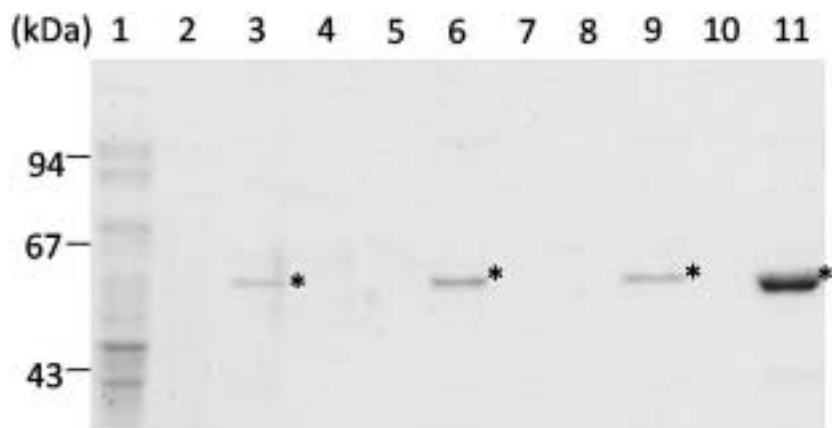


図3．Phi29 DNA ポリメラーゼの精製

レーン1～3はPhosphocellulose P-11カラム(一回目), レーン4～6はPhosphocellulose P-11(二回目), レーン7～9はBlue-Sepharose カラム, レーン10および11はHeparin-Sepharose カラムにより得られた画分, また, レーン1, 4, 7および10はカラム非吸着画分, レーン2, 5および8はカラム洗浄画分, レーン3, 6, 9および11は溶出された活性画分のSDS-PAGE電気泳動像. *は約66kDaのタンパク質を示す.

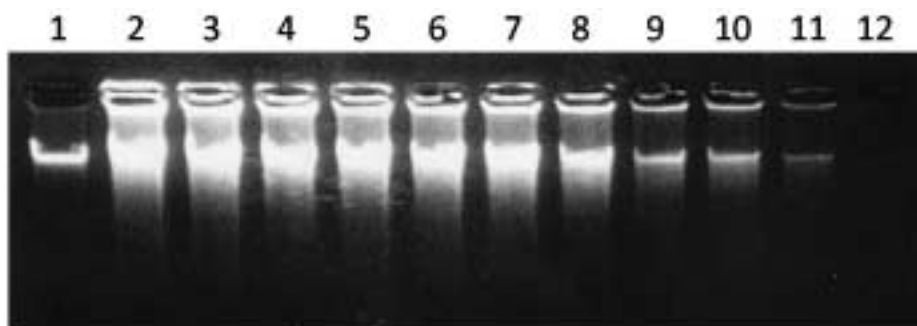


図4．MDA法に用いる鋳型DNA量の違いと増幅産物量の変化

レーン2～11はそれぞれ2,500, 1,250, 625, 313, 156もしくは78pgのDNAを鋳型として使用した際のMDA法による増幅産物, レーン12は鋳型DNAを含まないMDA産物, レーン1は100ngの未増幅のゲノミックDNAのアガロースゲル電気泳動像.

を用いて分析した. その結果, この抽出液中には約66kDaの分子量を示すタンパク質の存在が確認された. このタンパク質は, 35～65%飽和硫酸分画のうち約20%程度の量を占めており, 以前に報告されている天然型のPhi29 DNAポリメラーゼと分子量もほぼ一致していることから⁷⁾, 目的とする組換え型のPhi29 DNAポリメラーゼである可能性が高いと考えられた. また, 精製過程においても, この約66kDaのタンパク質の挙動とDNAポリメラーゼ活性は完全に一致しており, 最終的にこの約66kDaのタンパク質はSDS-PAGE上でほぼ単一のバンドとして精製された(図3). また, 精製段階が進むに従って酵素活性が高まっていることも確認された(データ未掲載).

更に本研究では, 非常に微量の鋳型DNAからのMDA法によるDNAの増幅を想定しているため, 大腸菌由来DNAの微量の混入も重大な問題となると考えられたことから, PEI処理によるDNAの除去を試みた. その結果, 未処理の酵素を用いたMDA法では, 鋳型DNAを含まない反応液においても残存する大腸菌DNAに由来すると考えられるDNAの増幅(デー

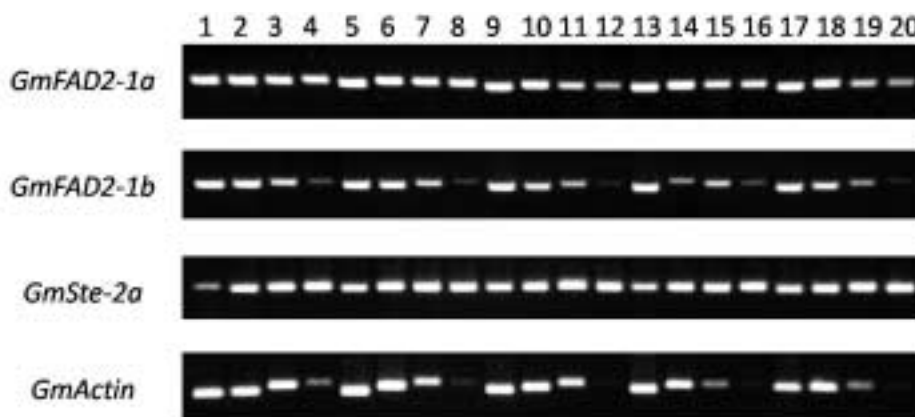


図5．MDA産物を鋳型とした際のPCR反応による遺伝子増幅

レーン1～4は未増幅のゲノミックDNA，レーン5～8はMDA法によって得られた未精製の増幅産物，レーン9～12はMDA法と2プロパノール沈澱，レーン13～16はMDA法とPEG沈澱，レーン17～20はMDA法とゲル濾過法の組み合わせによって得られた鋳型を，それぞれ，30，3，0.3もしくは0.03ngずつ用いてPCR反応を行った際のアガロースゲル電気泳動像．

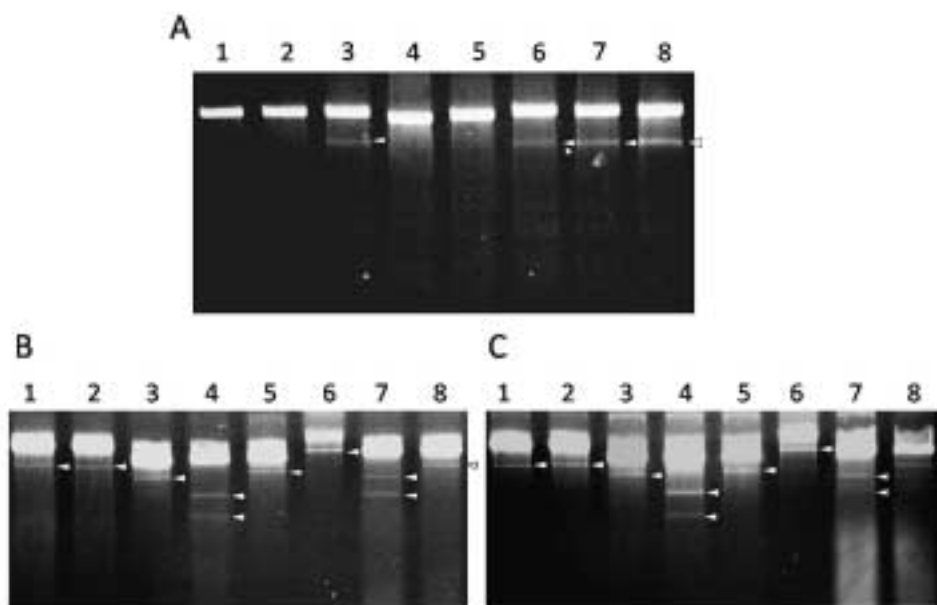


図6．MDA法で得られた増幅産物を用いたTILLING法による変異の検出

A：MDA産物の混合比率とTILLING産物の変化．未増幅（レーン1～3）もしくはMDA法により増幅した（レーン4～8）2種類（BayおよびKK21系統）のゲノミックDNAを，それぞれ，Bay：KK21＝1：0（レーン1および4），0：1（レーン2および5），1：1（レーン3および6），8：1（レーン7），16：1（レーン8）の比率で混合した鋳型を用いてTILLING法により変異を検出した際のアガロースゲル電気泳動像．矢印は切断されたDNA断片を示す．

B：未増幅のDNAプールを鋳型としたTILLING法による変異の検出．*GmFAD2-1b*（レーン1および2），*GmphyA1*（レーン3および4），*Gmβ-1,3-Glucanase*（レーン5，6および7）もしくは*GmFAD3-2a*（レーン8）遺伝子上に変異を持つ系統を含むDNAプールを鋳型として，TILLING法により変異を検出した際のアガロースゲル電気泳動像．

C：MDA法によって増幅したDNAプールを鋳型としたTILLING法による変異の検出．MDA法により増幅したDNAプールを鋳型として，パネルBと同様の実験を行った際のアガロースゲル電気泳動像．

タ未掲載)が確認されたのに対し、PEI 処理を行った場合には、17時間反応させた後でも全く大腸菌由来の DNA の増幅は検出されず(図4, lane 12), 宿主由来の DNA はほぼ完全に除去されたと考えられた。更に、過剰量の最終精製酵素を用いて DNA の増幅を行った場合にも DNA の分解は観察されず、本酵素は DNase 等の混入がほとんどない純度にまで精製されたことも確認された(データ未掲載)。

2. MDA 法による DNA の増幅と増幅産物の評価

本研究の目的の一つは、いかに微量の DNA から TILLING 法によるスクリーニングの鑄型を調整するかということである。そのため、先に精製した Phi29 DNA ポリメラーゼを使用して、MDA 法を行う際に最低限必要となる鑄型 DNA 量を明らかにするため、鑄型 DNA を 2.5ng から 1/2 ずつ順次希釈した反応液を調製して DNA の増幅を試みた。この結果、今回調製した全ての反応液においてダイズゲノム DNA の増幅が観察され(図4), 約78pg の鑄型を用いた場合まではほぼ等量の増幅産物の生成が確認された。これは、Dean⁸⁾のヒトゲノム DNA を用いた報告とほぼ同等な結果であり、今回の我々の実験では、78pg の鑄型 DNA から 2.5μg の増幅産物が得られたことから、増幅率は約32,000倍であった(図4, lane 7)。以上より、本研究で精製した酵素を用いた MDA 法は、少なくとも100pg 程度の鑄型 DNA が存在すれば、効率的に DNA の増幅が可能であることが明らかになった。

そこで、次に MDA 法による増幅のゲノムレベルでの均一性について評価するために、ダイズゲノム中に存在する4個の遺伝子(*GmFAD2-1a*, *GmFAD2-1b*, *GmSte-2a* および *GmActin*)に特異的なプライマーを用いて、PCR 法によるそれぞれの塩基配列の増幅を試みた。またこの際、MDA 法の反応液中に残存する高濃度のランダムプライマー等による PCR 反応への影響も懸念されたため、我々は MDA 法によって増幅された DNA を直接鑄型として使用する場合に、3種類の異なる方法により精製した DNA を鑄型とした場合についても増幅を試みた。その結果、MDA 法で増幅した DNA を鑄型として用いた全ての場合において、0.03ng の鑄型 DNA を使用した際に、有意な PCR 産物の減少が認められたものの、十分量の DNA を鑄型として用いた場合には、MDA 法による増幅の有無に関わらず、全てのプライマーセットでほぼ同等量の PCR 産物が得られており(図5), これらのプライマーセット間での増幅効率には、ほとんど差は認められなかったことから、MDA 法によりゲノム DNA 全体がほぼ均一に増幅されていることが確認された。

以上の結果より、今回 MDA 法によって増幅されたダイズゲノム DNA は未増幅の DNA と同様に PCR 等の鑄型として利用が可能であることが明らかになった。

3. MDA 法によって増幅した DNA を用いた TILLING 法による変異の検出

MDA 法により増幅された DNA は、鎖長が長く、複製エラーが少ないと報告されていることから^{10,12)}, 単一系統のゲノム DNA を鑄型とした場合の MDA 増幅産物は、TILLING 法による変異の検出にも使用可能であろうと予測された。しかしながら、数系統分のゲノム DNA を混合した DNA プールを鑄型として MDA 法により再増幅を行った場合も含め、MDA 法の増幅産物を鑄型として TILLING 法によるスクリーニングが可能であるかどうかについての情報は全く無かった。そこで、以前の我々の研究において¹⁶⁾*GmFAD2-1a* 遺伝子上に一塩基の欠失が生じていることが明らかにされている KK21系統と野生型の *GmFAD2-1a* 遺伝子を持つ Bay の DNA を異なる比率で混合した鑄型を MDA 法による増幅に用い、この増幅産物を TILLING 法に使用した際に変異の検出が可能であるかの検証を行った。この結果、野生型と変異型の DNA

の混合比率を16:1とした場合にも明確に切断されたバンドが確認された(図6A, lane 8)。この検出条件は、実際の TILLING 法によるスクリーニングの際に使用される8系統分のDNAプール中の1系統が、ヘテロで変異遺伝子を保持している場合とほぼ同等であり、実用的な感度で変異の検出が可能であることが示唆された。

そこで、実際のスクリーニングに用いているDNAプールを増幅した場合にも、突然変異の検出が可能であることを検証するため、4個の遺伝子(*GmFAD2-1b*, *GmphyA1*, *Gmβ-1,3-Glucanase* および *GmFAD3-2a*)について実際に TILLING 法によるスクリーニングで変異体を得られたDNAプールをMDA法により増幅し、これを鋳型とした際の TILLING 法による変異の検出を試みた。この結果、MDA法で増幅したDNAプールを用いた場合にも、未増幅の場合と比較してもほぼ遜色のない明瞭な切断バンドが確認され(図6C)、MDA法は、複数のマイナーアリルを含むDNAプールの増幅にも十分使用可能な手法であることが証明された。

以上の結果より、既に混合したダイズ突然変異体ライブラリーの増幅にもMDA法は有効であり、本法の利用により TILLING 法によるスクリーニングに用いる大規模な変異体集団のDNAプールの維持が飛躍的に容易になると考えられる。

摘 要

我々の研究室では、ゲノム情報を活用した逆遺伝学的手法によるダイズの遺伝子機能解析および分子育種についての研究を進めてきた。その一環として、X線やEMS等の変異原処理によって得られた約36,000の突然変異系統に対応するM3種子とゲノミックDNAからなる“ダイズ突然変異体ライブラリー”の開発および保存を行ってきた。この“突然変異体ライブラリー”は Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) 法等の逆遺伝学的手法を用いた研究に必要不可欠なものであるが、多種類の標的遺伝子に対するスクリーニングに使用するために十分量のゲノムDNAを確保することは極めて困難であった。このように多くの変異系統からのゲノムDNAの再抽出や処理スケールの拡大には莫大な労力を必要とし、現実的には極めて困難であることから、一旦作成したスクリーニング用のDNAセットを *in vitro* で効率的に再増幅する方法の開発が待たれていた。しかしながら、これまでに *in vitro* で再増幅したゲノミックDNAを鋳型として TILLING 法によるスクリーニングを行った例は報告されていない。

そこで本研究は、種々の *in vitro* でのゲノム増幅法のうちでも忠実性と増幅効率が高い Multiple Displacement Amplification (MDA) 法を用いて、“ダイズ突然変異体ライブラリー”の再増幅の効率を評価した。その結果、本研究で最適化されたMDA法により再増幅したゲノミックDNAは、TILLING法によるスクリーニングの鋳型として、十分な品質を備えていることが明らかになった。

引 用 文 献

1. McCallum C. M., L. Comai, E. A. Greene and S. Henikoff (2000). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* **123**, 439-442.
2. Watanabe S., R. Hideshima, Z. Xia, Y. Tsubokura, S. Sato, Y. Nakamoto, N. Yamanaka, R. Takahashi, M. Ishimoto, T. Anai, S. Tabata and K. Harada (2009). Map-based cloning of the gene associated with soybean maturity locus *E3*. *Genetics*. **182**, 1251-1262.

- 3 . Telenius H., N. P. Carter, C. E. Bebb, M. Nordenskjöld, B. A. Ponder and A. Tunnacliffe (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. **13**, 718-725.
- 4 . Zhang L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi and N. Arnheim (1992). Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 5847-5851.
- 5 . Cheung V. G. and S. F. Nelson (1996). Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 14676-14679.
- 6 . Coskun S. and O. Alsmadi (2007). Whole genome amplification from a single cell: a new era for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn*. **27**, 297-302.
- 7 . Blanco L. and M. Salas (1984). Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **81**, 5325-5329.
- 8 . Dean F. B., S. Hosono, L. Fang, X. Wu, A.F. Faruqi, P. Bray-Ward, Z. Sun, Q. Zong, Y. Du, J. Du, M. Driscoll, W. Song, S. F. Kingsmore, M. Egholm and R. S. Lasken (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 5261-5266.
- 9 . Garmendia C., A. Bernad, J.A. Esteban, L. Blanco and M. Salas (1992). The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J Biol Chem*. **267**, 2594-2599.
- 10 . Esteban J. A., M. Salas and L. Blanco (1993). Fidelity of phi 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J Biol Chem*. **268**, 2719-2726.
- 11 . Blanco L., A. Bernad, J. M. Lázaro, G. Martín, C. Garmendia and M. Salas (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem*. **264**, 8935-8940.
- 12 . Lovmar L. and A. C. Syvänen (2006). Multiple displacement amplification to create a long-lasting source of DNA for genetic studies. *Hum Mutat*. **27**, 603-614.
- 13 . Iizasa E. and Y. Nagano (2006). Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/*Escherichia coli* shuttle vectors. *Biotechniques*. **40**, 79-83.
- 14 . Lázaro J. M., L. Blanco and M. Salas (1995). Purification of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Methods in Enzymology*. **262**, 42-49.
- 15 . Murray M. G. and W. F. Thompson (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. **8**, 4321-4325.
- 16 . Anai T., T. Yamada, R. Hideshima, T. Kinoshita, S. M. Rahman and Y. Takagi (2008). Two high-oleic-acid soybean mutants, M23 and KK21, have disrupted microsomal omega-6 fatty acid desaturase, encoded by *GmFAD2-1a*. *Breed Sci*. **58**, 447-452.